

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 février 2001 (15.02.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/01725	Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543
Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 juin 2000 (21.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 juin 1999 (22.06.99)
Déposant PIERRARD, Jérôme etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

14 décembre 2000 (14.12.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
 34, chemin des Colombettes
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Kiwa Mpay

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

TRAITEMENT DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

JACOBSON, Claude
Cabinet Lavoix
2, place d'Estienne d'Orves
F-75441 Paris Cedex 09
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 26 avril 2001 (26.04.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543	
Demande internationale no PCT/FR00/01725	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 juin 2000 (21.06.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☐ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse RHODIA CHIMIE 25, quai Paul Doumer F-92408 Coubevoie Cedex FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse RHODIA CHIMIE 26, quai Alphonse-Le Gallo F-92512 Boulogne Billancourt Cedex FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☒ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Jocelyne Rey-Millet
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE VETS
PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 01725	Date du dépôt international(jour/mois/année) 21/06/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 22/06/1999
Déposant RHODIA CHIMIE		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.



Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.



la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

- b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :



contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.



déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.



La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.



La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. ☐ **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.



Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

SOUCHES AVIRULENTES DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS, PRODUISANT DU XANTHANE

5. En ce qui concerne l'abrégé,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant



le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°



suggérée par le déposant.



parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.



parce que cette figure caractérise mieux l'invention.



Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01725

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/31 C12P19/06 C07K14/21 C12N1/21 //(C12N1/21, C12R1:64)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12P C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EMBL, STRAND, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KAMOUN S ET AL: "A PLANT-INDUCIBLE GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS ENCODES AN EXOCELLULAR COMPONENT REQUIRED FOR GROWTH IN THE HOST AND HYPERSENSITIVITY ON NONHOSTS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY 1990, vol. 172, no. 9, 1990, pages 5165-5172, XP000906789 ISSN: 0021-9193	1-8, 15
Y	abrégé --- -/--	9-12



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01725

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ARLAT M ET AL: "XANTHOMONAS-CAMPESTRIS CONTAINS A CLUSTER OF HRP GENES RELATED TO THE LARGER HRP CLUSTER OF PSEUDOMONAS-SOLANACEARUM"</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1991, vol. 4, no. 6, 1991, pages 593-601, XP000908703</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande</p> <p>abrégé</p> <p>page 598, colonne de droite, alinéa 5</p> <p>page 599, colonne de droite, dernier alinéa</p>	1-8, 15
X	<p style="text-align: center;">----</p> <p>OSBOURN A E ET AL: "IDENTIFICATION AND DNA SEQUENCE OF A PATHOGENICITY GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS"</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1990, vol. 3, no. 5, 1990, pages 280-285, XP000901966</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande</p> <p>abrégé</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1, 2, 4-6

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>FENSELAU S ET AL: "Determinants of pathogenicity in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatori</i> related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals."</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS., vol. 5, no. 5, octobre 1992 (1992-10), pages 390-396, XP000908705</p> <p>APS PRESS, ST. PAUL, MN, US</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande</p>	17-19
Y	<p>1e document en entier</p> <p>-& DATABASE EMBL 'en ligne!</p> <p>AC M99176, 10 septembre 1993 (1993-09-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "<i>Xanthomonas campestris</i> HrpC2 gene, complete cds"</p> <p>XP002137003</p> <p>* 87.2% d'identité (1188 paires de bases) avec SEQ ID NO 3 *</p> <p>-& DATABASE EMBL 'en ligne!</p> <p>AC U33548, 10 novembre 1995 (1995-11-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "<i>Xanthomonas campestris</i> hrpB pathogenicity locus proteins HrpB1, HrpB2, HrpB3, HrpB4, HrpB5, HrpB6, HrpB7, HrpB8, HrpA1, and ORF62 genes, complete cds."</p> <p>XP002137004</p> <p>* 78.8% d'identité (1043 paires de bases) avec SEQ ID NO 6 *</p> <p>* 80.2% d'identité (702 paires de bases) avec SEQ ID NO 7 *</p> <p>-----</p>	9-12

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

5

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Destinataire:

JACOBSON, Claude
Cabinet Lavoix
2, place d'Estienne d'Orvès
F-75441 Paris Cedex 09
FRANCE

PTO/PCT Rec'd 21 DEC 2001

PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(règle 71.1 du PCT)

DI 30.09.01

Date d'expédition
(jour/mois/année) 31.07.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
BET 00/0543

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR00/01725

Date du dépôt international (jour/mois/année)
21/06/2000

Date de priorité (jour/mois/année)
22/06/1999

Déposant
RHODIA CHIMIE et al.

9907 463

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Büchler, S

Tél. +49 89 2399-8090



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)


Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01725	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/06/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 22/06/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/31		
Déposant RHODIA CHIMIE et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 1 feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 14/12/2000	Date d'achèvement du présent rapport 31.07.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Halle, F N° de téléphone +49 89 2399 8537



RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01725

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-18 version initiale

Revendications, N°:

8-19 version initiale

1-7 reçue(s) le 10/07/2001 avec la lettre du 10/07/2001

Dessins, feuilles:

1/2,2/2 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-3, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: -, qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01725

- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :
voir feuille séparée

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Point I.6

1. La demande contient des feuilles de liste de séquences, feuilles numérotées de 1 à 3.

Point V

2. Dans ce rapport, il est fait référence aux documents suivants:

D1: J. Bac. 172, 1990, p. 5165-5172

D2: Mol. Plant-Microbe Interactions 4, 1991, p. 593-601 (cité dans la demande)

D3: Mol. Plant-Microbe Interactions 3, 1990, p. 280-285 (cité dans la demande)

D4: Mol. Plant-Microbe Interactions 5, 1992, p. 390-396 (cité dans la demande)

3. Compte tenu de l'état de la technique représenté par les documents D1-D4, l'objet des revendications 1-19 semble être nouveau et impliquer une activité inventive (Article 33(2)(3)) PCT).

En effet, comme l'a expliqué le demandeur, les souches modifiées connues (cf. D1-D4) comportent toutes des séquences d'ADN étranger au patrimoine génétique naturel de Xanthomonas campestris alors que la souche de l'invention ne contient pas d'ADN étranger à son patrimoine génétique naturel. De ce fait, il n'est pas possible de prévoir sur la seule base des données de l'état de la technique, si les souches modifiées selon l'invention sont, entre autres, non pathogènes et capables de produire des exopolysaccharides.

Point VIII

4. Les revendications indépendantes 11 et 12 ne semblent pas contenir toutes les caractéristiques techniques de l'invention (Article 6, Règle 6.3(a) PCT).
L'invention a pour objet (voir description page 4, lignes 24-26) une souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène et conservé la capacité de production d'exopolysaccharide. Cependant, les souches des revendications 11 et 12 ne sont pas définies dans ce sens.
5. En vue de la définition de l'objet revendiqué (revendications 17-19), les

séquences nucléotidiques devraient être également caractérisées par leur fonction ou rôle biologique (Article 6, Règle 6.3(a) PCT).

6. La définition de l'objet revendiqué selon les termes de "essentiellement non phytopathogène" (revendications 10-12) introduit une incertitude quant à la phytopathogénicité restante réelle des souches bactériennes de ces revendications (Article 6, Règle 6.3(a) PCT). Par ailleurs, cette définition introduit également une ambiguïté quant au caractère non phytopathogène des souches bactériennes des revendications 10 à 12 et des souches des revendications 1 à 9 qui ne sont pas qualifiées de "essentiellement non phytopathogène".
7. Contrairement à ce qu'exige la Règle 5.1(a)(ii) PCT, la description ne cite pas le document D1 reflétant également la technique antérieure.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

PTO/PCT Rec'd 21 DEC 2001

Destinataire:

JACOBSON, Claude
Cabinet Lavoix
2, place d'Estienne d'Orves
F-75441 Paris Cedex 08
FRANCE

REÇU LE

07 MAI 2001

Cabinet LAVOIX

Date d'expédition (jour/mois/année) 26 avril 2001 (26.04.01)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR00/01725	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 juin 2000 (21.06.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☐ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse RHODIA CHIMIE 25, quai Paul Doumer F-92408 Coubevoie Cedex FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse RHODIA CHIMIE 26, quai Alphonse-Le-Gallo F-92512 Boulogne Billancourt Cedex FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés
<input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Jocelyne Rey-Millet no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

①

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

PCT Reg'd 21 DEC 2000

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA
COMMUNICATION DE LA DEMANDE
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Destinataire:

JACOBSON, Claude
Cabinet Lavoix
2, place d'Estienne d'Orves
F-75441 Paris Cedex 09
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 28 décembre 2000 (28.12.00)		AVIS IMPORTANT	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543			
Demande internationale no PCT/FR00/01725	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 juin 2000 (21.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 juin 1999 (22.06.99)	
Déposant RHODIA CHIMIE etc 9907963			

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:
AG,AU,BZ,DZ,KP,KR,MZ,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW
La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).
3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 28 décembre 2000 (28.12.00) sous le numéro WO 00/78967

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la **demande d'examen préliminaire international** doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé J. Zahra
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

2

PCT

PTO/PCT Rec'd 21 DEC 2001
 INFORMATIONS RELATIVES AUX
 OFFICES ELUS QUI ONT RECU
 NOTIFICATION DE LEUR ELECTION

(règle 61.3 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

JACOBSON, Claude
 Cabinet Lavoix
 2, place d'Estienne d'Or
 F-75441 Paris Cedex 09
 FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 février 2001 (15.02.01)		INFORMATION IMPORTANTE	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543			
Demande internationale no PCT/FR00/01725	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 juin 2000 (21.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 juin 1999 (22.06.99)	
Déposant RHODIA CHIMIE etc 9307363			

1. Le déposant est informé que le Bureau international a, conformément à l'article 31.7), notifié à chacun des offices suivants son élection:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, CA, CN, CZ, DE, IL, JP, KP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. Les offices suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle ils sont notifiés de leur élection; la notification de leur élection leur sera envoyée par le Bureau international seulement à leur demande:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BR, BY, BZ, CH, CR, CU, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB,
 GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW,
 MX, MZ, PT, SD, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices mentionnés ci-dessus avant l'expiration d'un délai de 30 mois à compter de la date de priorité. Pour ce faire, il doit payer la ou les taxes nationales et remettre, si elle est prescrite, une traduction de la demande internationale (article 39.1)a) ainsi que, le cas échéant, une traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3)b) et règle 74.1).

Certains offices ont fixé des délais supérieurs au délai mentionné ci-dessus. Pour des renseignements détaillés au sujet des délais applicables et des actes à accomplir à l'ouverture de la phase nationale auprès d'un office donné, voir le volume II du Guide du déposant du PCT.

L'ouverture de la phase régionale européenne est différée jusqu'à l'expiration d'un délai de 31 mois à compter de la date de priorité pour la totalité des Etats désignés aux fins de l'obtention d'un brevet européen.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Kiwa Mpay <i>KMP</i> no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	--

Translation 500

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/2900

MAY 06 2002

RECEIVED

8

Applicant's or agent's file reference SAGEM 9809216	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/01725	International filing date (day/month/year) 15 July 1999 (15.07.99)	Priority date (day/month/year) 20 July 1998 (20.07.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC H04L 29/06		
Applicant SAGEM S.A.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 04 February 2000 (04.02.00)	Date of completion of this report 24 October 2000 (24.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01725

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1, 5-13, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages 2, 2a, 3, 4, filed with the letter of 21 July 2000 (21.07.2000),
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 2-10, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1, filed with the letter of 21 July 2000 (21.07.2000),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/3-3/3, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01725

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I

The International Preliminary Examining Authority considers that the following amendment to method Claim 1 goes beyond the disclosure of the invention in the international application as filed (PCT Article 34(2)):

"method characterized in that the **receiver is locked** by moving the position of the address field to a new position in the transmitter".

The report has therefore been established as if said amendment to Claim 1 had not been made (PCT Rule 70.2(c)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/01725

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: EP-A-0 841 813 (PHILIPS ELECTRONICS NV) 13 May 1998

D2: US-A-5 420 866 (WASILEWSKI ANTHONY J) 30 May 1995

D3: US-A-5 619 501 (CHANEY JOHN W ET AL) 8 April 1997

D4: US-A-5 651 002 (READY DAVID C ET AL) 22 July 1997

1. If Claim 1 is interpreted in light of the description and considered to be only a method for technically upgrading a receiver of data broadcast in packets, the subject matter thereof does not involve an inventive step. Indeed, document D1 describes a method for technically upgrading a data receiver (video data with their transmission and reception protocol) [...], which enables the receiver to be unlocked by loading into same a data block (new software) (column 1, lines 19-22) comprising data for programming a processor (column 3, line 18 - column 4, line 25).

The only difference between the method of Claim 1 and the method described in document D1 is the programmable combinatory logic circuits which work in conjunction with the processor in one case (Claim 1), instead of an application program memory (FLASH) which works in combination with the processor in the other case (document D1).

However, it does not appear that such a difference can be considered inventive, since it does not appear to go beyond the competence of a person skilled in the art working in the field of data transmitters and receivers.

Indeed, two devices (the flash memory and the processor) have simply been replaced with another two devices (the programmable memory circuits and the processor) in order to achieve the same result, i.e., the upgrading of a receiver.

The subject matter of Claim 1 therefore does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

2. The subject matter of Claim 5 is simply the removable storage medium for transporting the data for upgrading a receiver according to the method of Claim 1, and therefore does not involve an inventive step either (PCT Article 33(3)).

3. Dependent Claims 2-4 and 7-10 do not appear to contain additional features which, in combination with the subject matter of the claim on which they depend, could involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

Said additional features are either known or

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01725

directly derivable from the cited documents, or are
alternative embodiments that have no inventive
meaning of their own.

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. In order to meet the requirements of PCT Rule 6.3(b), the independent claims should have been **properly** presented in the two-part form, with the features found in combination in the prior art (see document D1) being indicated in the first part.
2. In order to meet the requirements of PCT Rule 5.1(a)(iii), the part of the description that discloses the technical problem and the solution to this problem should be revised, in view of D1 (cf. PCT Preliminary Examination Guidelines, II 4.5).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. It is clear from the description that the following features are necessary for the definition of the invention (page 5, line 17 - page 6, line 19 and page 8, lines 25-32 for feature (a), which is considered necessary, since it is the only possibility (only example) for carrying out the invention, and page 3, lines 26-29 and page 7, lines 17-18 for feature (b)):

(a) the step of defining a field (20) in the packet to be transmitted (P2) with a predetermined data pattern which shifts the position of the address field (12) to a new position (22),

(b) "loading a data block" by means of a removable storage medium.

Since independent Claim 1 does not contain these features, it does not meet the requirements of PCT Article 6, in combination with PCT Rule 6.3 (b), according to which an independent claim must contain all the technical features necessary for the definition of the invention.

- 2.1 The subject matter of Claim 1 has not been clearly defined, contrary to the requirements of PCT Article 6, since many of the definitions in the claim are not consistent.

(i) Are "the programmable circuits" on lines 10 and 17 the same as the "programmable combinatory logic circuits" on line 8?

VIII. Certain observations on the international application

(ii) Is the "address field" on lines 8 and 13 the same as the "destination address field" on line 6?

(iii) Is the "loaded block" on line 23 the same as the "data block" on line 15?

2.2 The expression "by addressing" used in Claim 1 is not clear (PCT Article 6) because it is impossible to understand what is being "addressed".

3. It is clear from page 8, lines 17-32 of the description that the following features are necessary for the definition of the invention as claimed in Claim 6:

(a) a transmitter that transmits data in packets with the position of the destination address field (12) being moved;

(b) the address field (12) being moved to a new position (22) by a field having a predetermined data pattern (20).

Since independent Claim 6 does not contain these features, it does not meet the requirements of PCT Article 6, in combination with PCT Rule 6.3(b), according to which an independent claim must contain all the technical features necessary for the definition of the invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No

PCT/F/01725

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/31 C12P19/06 C07K14/21 C12N1/21 //(C12N1/21,
C12R1:64)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

P10P11 REC'D 21 DEC 2001

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBL, STRAND, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAMOUN S ET AL: "A PLANT-INDUCIBLE GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS ENCODES AN EXOCELLULAR COMPONENT REQUIRED FOR GROWTH IN THE HOST AND HYPERSENSITIVITY ON NONHOSTS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY 1990, vol. 172, no. 9, 1990, pages 5165-5172, XP000906789 ISSN: 0021-9193	1-8,15
Y	abstract ----- -/--	9-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 2000

Date of mailing of the international search report

23/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: 1al Application No

PCT/EP 92/01725

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ARLAT M ET AL: "XANTHOMONAS-CAMPESTRIS CONTAINS A CLUSTER OF HRP GENES RELATED TO THE LARGER HRP CLUSTER OF PSEUDOMONAS-SOLANACEARUM" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1991, vol. 4, no. 6, 1991, pages 593-601, XP000908703 ISSN: 0894-0282 cited in the application abstract page 598, right-hand column, paragraph 5. page 599, right-hand column, last paragraph</p> <p>-----</p> <p>OSBOURN A E ET AL: "IDENTIFICATION AND DNA SEQUENCE OF A PATHOGENICITY GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1990, vol. 3, no. 5, 1990, pages 280-285, XP000901966 ISSN: 0894-0282 cited in the application abstract</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	<p>1-8,15</p> <p>1,2,4-6</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT 00/01725

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FENSELAU S ET AL: "Determinants of pathogenicity in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatori</i> related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals."</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS., vol. 5, no. 5, October 1992 (1992-10), pages 390-396, XP000908705</p> <p>APS PRESS, ST. PAUL, MN, US</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cited in the application</p>	17-19
Y	<p>the whole document</p> <p>-& DATABASE EMBL 'Online!</p> <p>AC M99176, 10 September 1993 (1993-09-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris HrpC2 gene, complete cds"</p> <p>XP002137003</p> <p>87.2% identity (1188 base pairs) with SEQ ID NO 3</p> <p>-& DATABASE EMBL 'Online!</p> <p>AC U33548, 10 November 1995 (1995-11-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris hrpB pathogenicity locus proteins HrpB1, HrpB2, HrpB3, HrpB4, HrpB5, HrpB6, HrpB7, HrpB8, HrpA1, and ORF62 genes, complete cds."</p> <p>XP002137004</p> <p>78.8% identity (1043 base pairs) with SEQ ID NO 6</p> <p>80.2% identity (702 base pairs) with SEQ ID NO 7</p>	9-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar 'nternationale No

PCT/ 0/01725

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/31 C12P19/06 C07K14/21 C12N1/21 //(C12N1/21,
C12R1:64)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12P C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EMBL, STRAND, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KAMOUN S ET AL: "A PLANT-INDUCIBLE GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS ENCODES AN EXOCELLULAR COMPONENT REQUIRED FOR GROWTH IN THE HOST AND HYPERSENSITIVITY ON NONHOSTS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY 1990, vol. 172, no. 9, 1990, pages 5165-5172, XP000906789 ISSN: 0021-9193	1-8, 15
Y	abrégé ----- -/-	9-12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ARLAT M ET AL: "XANTHOMONAS-CAMPESTRIS CONTAINS A CLUSTER OF HRP GENES RELATED TO THE LARGER HRP CLUSTER OF PSEUDOMONAS-SOLANACEARUM"</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1991, vol. 4, no. 6, 1991, pages 593-601, XP000908703</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande abrégé</p> <p>page 598, colonne de droite, alinéa 5</p> <p>page 599, colonne de droite, dernier alinéa</p>	1-8,15
X	<p>OSBOURN A E ET AL: "IDENTIFICATION AND DNA SEQUENCE OF A PATHOGENICITY GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS"</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1990, vol. 3, no. 5, 1990, pages 280-285, XP000901966</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande abrégé</p>	1,2,4-6

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>FENSELAU S ET AL: "Determinants of pathogenicity in Xanthomonas campestris pv. vesicatori related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals."</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS., vol. 5, no. 5, octobre 1992 (1992-10), pages 390-396, XP000908705</p> <p>APS PRESS, ST. PAUL, MN, US</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande</p>	17-19
Y	<p>le document en entier</p> <p>-& DATABASE EMBL 'en ligne!</p> <p>AC M99176, 10 septembre 1993 (1993-09-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris HrpC2 gene, complete cds"</p> <p>XP002137003</p> <p>* 87.2% d'identité (1188 paires de bases) avec SEQ ID NO 3 *</p> <p>-& DATABASE EMBL 'en ligne!</p> <p>AC U33548, 10 novembre 1995 (1995-11-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris hrpB pathogenicity locus proteins HrpB1, HrpB2, HrpB3, HrpB4, HrpB5, HrpB6, HrpB7, HrpB8, HrpA1, and ORF62 genes, complete cds."</p> <p>XP002137004</p> <p>* 78.8% d'identité (1043 paires de bases) avec SEQ ID NO 6 *</p> <p>* 80.2% d'identité (702 paires de bases) avec SEQ ID NO 7 *</p> <p>-----</p>	9-12



TRAITÉ DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

03/11/2001

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01725	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/06/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 22/06/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/31		
Déposant RHODIA CHIMIE et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 1 feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 14/12/2000	Date d'achèvement du présent rapport 31.07.2001	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Halle, F N° de téléphone +49 89 2399 8537 	

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01725

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-18 version initiale

Revendications, N°:

8-19 version initiale

1-7 reçue(s) le 10/07/2001 avec la lettre du 10/07/2001

Dessins, feuilles:

1/2,2/2 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-3, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01725

- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :
voir feuille séparée

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	1-19
	Non :	Revendications	
Activité inventive	Oui :	Revendications	1-19
	Non :	Revendications	
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-19
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Point I.6

1. La demande contient des feuilles de liste de séquences, feuilles numérotées de 1 à 3.

Point V

2. Dans ce rapport, il est fait référence aux documents suivants:

D1: J. Bac. 172, 1990, p. 5165-5172

D2: Mol. Plant-Microbe Interactions 4, 1991, p. 593-601 (cité dans la demande)

D3: Mol. Plant-Microbe Interactions 3, 1990, p. 280-285 (cité dans la demande)

D4: Mol. Plant-Microbe Interactions 5, 1992, p. 390-396 (cité dans la demande)

3. Compte tenu de l'état de la technique représenté par les documents D1-D4, l'objet des revendications 1-19 semble être nouveau et impliquer une activité inventive (Article 33(2)(3)) PCT).

En effet, comme l'a expliqué le demandeur, les souches modifiées connues (cf. D1-D4) comportent toutes des séquences d'ADN étranger au patrimoine génétique naturel de Xanthomonas campestris alors que la souche de l'invention ne contient pas d'ADN étranger à son patrimoine génétique naturel. De ce fait, il n'est pas possible de prévoir sur la seule base des données de l'état de la technique, si les souches modifiées selon l'invention sont, entre autres, non pathogènes et capables de produire des exopolysaccharides.

Point VIII

4. Les revendications indépendantes 11 et 12 ne semblent pas contenir toutes les caractéristiques techniques de l'invention (Article 6, Règle 6.3(a) PCT).
L'invention a pour objet (voir description page 4, lignes 24-26) une souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène et conservé la capacité de production d'exopolysaccharide. Cependant, les souches des revendications 11 et 12 ne sont pas définies dans ce sens.
5. En vue de la définition de l'objet revendiqué (revendications 17-19), les

séquences nucléotidiques devraient être également caractérisées par leur fonction ou rôle biologique (Article 6, Règle 6.3(a) PCT).

6. La définition de l'objet revendiqué selon les termes de "essentiellement non phytopathogène" (revendications 10-12) introduit une incertitude quant à la phytopathogénicité restante réelle des souches bactériennes de ces revendications (Article 6, Règle 6.3(a) PCT). Par ailleurs, cette définition introduit également une ambiguïté quant au caractère non phytopathogène des souches bactériennes des revendications 10 à 12 et des souches des revendications 1 à 9 qui ne sont pas qualifiées de "essentiellement non phytopathogène".
7. Contrairement à ce qu'exige la Règle 5.1(a)(ii) PCT, la description ne cite pas le document D1 reflétant également la technique antérieure.

modif

BFF

REVENDICATIONS

1. Souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide et ne contenant pas d'ADN étranger à son patrimoine génétique naturel.

2. Souche bactérienne selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a été rendue stablement non phytopathogène par inactivation d'au moins un gène, avantageusement au moins deux gènes, de préférence au moins trois gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

3. Souche bactérienne selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle a été rendue stablement non phytopathogène par inactivation de 5 à 9 gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

4. Souche bactérienne selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une souche *Xanthomonas* ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

5. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est de l'espèce *Xanthomonas campestris*.

6. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de *Xanthomonas campestris* pv *campestris*.

7. Souche *Xanthomonas* selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'inactivation du ou desdit(s) gèn (s) est obtenue par délétion d'une région d'ADN d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et en ce qu'elle conserve la capacité de produire de l'exopolysaccharide

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

76

Translation
10/01/8786
5000

Applicant's or agent's file reference BET 00/0543	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01725	International filing date (day/month/year) 21 June 2000 (21.06.00)	Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/31		
Applicant RHODIA CHIMIE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 1 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14 December 2000 (14.12.00)	Date of completion of this report 31 July 2001 (31.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01725

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☐ the description. pages 1-18 . as originally filed.
 pages _____ . filed with the demand.
 pages _____ . filed with the letter of _____ .
 pages _____ . filed with the letter of _____ .
- ☐ the claims. Nos. 8-19 . as originally filed.
 Nos. _____ . as amended under Article 19.
 Nos. _____ . filed with the demand.
 Nos. 1-7 . filed with the letter of 10 July 2001 (10.07.2001) .
 Nos. _____ . filed with the letter of _____ .
- ☐ the drawings. sheets/fig 1/2.2/2 . as originally filed.
 sheets/fig _____ . filed with the demand.
 sheets/fig _____ . filed with the letter of _____ .
 sheets/fig _____ . filed with the letter of _____ .

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages _____
- ☐ the claims. Nos. _____
- ☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01725

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

1. The application includes sheets containing lists of sequences; these sheets are numbered from 1 to 3.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01725

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

2. The following documents are referred to in this report:

D1: J. Bac. 172, 1990, pages 5165-5172

D2: Mol. Plant-Microbe Interactions 4, 1991, pages 593-601 (cited in the application)

D3: Mol. Plant-Microbe Interactions 3, 1990, pages 280-285 (cited in the application)

D4: Mol. Plant-Microbe Interactions 5, 1992, pages 390-396 (cited in the application).

3. In relation to the prior art disclosed in documents D1-D4, the subject matter of Claims 1-19 appears to be novel and to involve an inventive step (PCT Article 33(2) and (3)).

Indeed, as explained by the applicant, the known modified strains (see D1-D4) all contain DNA sequences which do not belong to the natural genetic base of Xanthomonas campestris, whereas the strain of the present invention contains no DNA alien to its natural genetic base. Consequently, it is impossible to predict, solely on the basis of the prior art data, whether the modified strains of the invention are, *inter alia*, non-pathogenic and capable of producing exopolysaccharides.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

3. Independent Claims 11 and 12 do not appear to contain all the characterising technical features of the invention (PCT Article 6 and Rule 6.3(a)).
The invention concerns (see description on page 4, lines 24-26) a bacterial strain which has lost its phytopathogenic activity and retained its ability to produce exopolysaccharides. However, the strains of Claims 11 and 12 are not defined in that way.
5. In view of the definition of the claimed subject matter (Claims 17-19), the nucleotide sequences ought likewise to be characterised by their biological function or role (PCT Article 6 and Rule 6.3(a)).
6. The definition of the claimed subject matter as being "essentially non phytopathogenic" (Claims 10-12) introduces doubt as to the actual remaining phytopathogenicity of the bacterial strains of these claims (PCT Article 6 and Rule 6.3(a)). In addition, this definition creates ambiguity as to the non-phytopathogenic nature of the bacterial strains of Claims 10-12 and of the strains of Claims 1-9, which are not referred to as being "essentially non-phytopathogenic".
7. Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not mention D1, which also reflects the prior art.

Rec'd on 21 Dec 01

34 AMDT

CLAIMS

1. A bacterial strain which has lost the
phytopathogenic nature by inactivation of at least one
5 virulence gene, and which has conserved the ability to
produce exopolysaccharide.

2. The bacterial strain as claimed in claim
1, characterized in that it has been made stably
nonphytopathogenic by inactivation of at least one
10 gene, advantageously at least two genes, preferably at
least three genes, of the *hrp* or *hrc* gene group.

3. The bacterial strain as claimed in claim
1 or claim 2, characterized in that it has been made
stably nonphytopathogenic by inactivation of 5 to 9
15 genes of the *hrp* or *hrc* gene group.

4. The bacterial strain as claimed in claim
1, characterized in that it is a *Xanthomonas* strain
which has lost the phytopathogenic nature by
inactivation of at least one virulence gene, and which
20 has conserved the ability to produce exopolysaccharide.

5. The *Xanthomonas* strain as claimed in
claim 4, characterized in that it is of the species
Xanthomonas campestris.

6. The *Xanthomonas* strain as claimed in
25 claim 5, characterized in that it is *Xanthomonas*
campestris pv *campestris*.

7. The *Xanthomonas* strain as claimed in any

one of the preceding claims, characterized in that the inactivation of said gene(s) is obtained by deletion of a region of DNA of at least 1 kb, preferably at least 3 kb, advantageously at least 5 kb, in the *hrp* or *hrc* gene group, and in that it conserves the ability to produce exopolysaccharide.

8. The *Xanthomonas* strain as claimed in any one of the preceding claims, characterized in that it comprises a deletion of a region of DNA of at most 40 kb.

9. The *Xanthomonas* strain as claimed in claim 8, characterized in that it is obtained by deletion of all or part of the *hrp A1* to *hrpC2* genes.

10. An essentially nonphytopathogenic *Xanthomonas* strain, characterized in that it comprises a deletion of a region of DNA of at least 1 kb, preferably at least 3 kb, advantageously at least 5 kb, in the *hrp* or *hrc* gene group, and in that it conserves the ability to produce exopolysaccharide.

11. An essentially nonphytopathogenic *Xanthomonas* strain, characterized in that it is obtained by deletion of all or part of the *hrp A1-C2* genes.

12. An essentially nonphytopathogenic *Xanthomonas campestris* strain, chosen from the BIOCAT 1016, BIOCAT 1017, BIOCAT 1019, BIOCAT 1021 and

BIOCAT 1022 strains, deposited at the CBS under the numbers CBS 101940, CBS 101941, CBS 101942, CBS 101943 and CBS 101944, respectively.

13. The *Xanthomonas* strain as claimed in one of claims 4 to 13, characterized in that the exopolysaccharide is a xanthan gum.

14. A pRPA-BCAT 140 plasmid, used for manufacturing the strain as claimed in claims 9 to 13.

15. A method for preparing a strain as claimed in any one of claims 7 to 13, characterized in that the strain is obtained by homologous recombination with a plasmid comprising a deletion of all or part of the *hrp* or *hrc* genes.

16. A method for preparing bacterial exopolysaccharide, in particular xanthan gum, characterized in that a bacterial strain, where appropriate of the *Xanthomonas* genus, preferably of the species *Xanthomonas campestris* as claimed in any one of claims 1 to 13, is cultured under conditions which allow the production of exopolysaccharide in the fermentation medium.

17. A nucleic acid, characterized in that it comprises the nucleotide sequence SEQ ID No. 3.

18. A nucleic acid, characterized in that it comprises the nucleotide sequence SEQ ID No. 6.

19. A nucleic acid, characterized in that it

comprises the nucleotide sequence SEQ ID No. 7.

10/018786

Rec'd PCT/PTC 21 DEC 2001

PCT/FR00/01725

WO 00/78967

1

SEQUENCE LISTING

<110> RHODIA CHIMIE

<120> Novel bacterial strains, especially strains of Xanthomonas, in particular Xanthomonas campestris

<130> BFF 99/0315

<140> FR 9907963

<141> 1999-06-22

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence description: primer

<400> 1

aaattcgtca agggatgatgc 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence description: primer

<400> 2

gttcacactg gtcgacaagc 20

<210> 3

<211> 1189

<212> DNA

<213> Xanthomonas campestris

<400> 3

```

aaactcgtca aggggtgatgc gatcgccggc ctgggtgatca ccatgggtcaa catcttggcc 60
ggcatcgtgg taggcgtgac ctaccacggc atgagcgcgg gcgaggccgc caaccgcttt 120
gcgacccgtg cggtaggcga tgcgatggtg tcgcagatcg cctcgtgct gatctcgggtg 180
gcggccggcg tcatgatcac ccgcgtcgcc aacgagaatg aaaccaagat cagctcggctc 240
gggctcgaca tcggcccgcca gtcaccagc aacgcacgtg ccttgatggc agcgagtgtg 300
ctgctggcct gctttgctt cgtgcccggg tttccggcg tgctgttct gctgctggca 360
gcggccggcg gtgcccgggg ctatacgatc tggcgcaagc aacgcgacac cagcggggagc 420
gatcagcccc cactgccatc aaccagccgc aaagggtgcca aaggcgatgc gccgcacatc 480
cgcaagagcg ccccggtatt cgccctcgcc ttgtcgatgc ggctttcgcc gcaactggct 540
gcacggctcg acccggcgct gctggatcag gcgatcgaaa gcgagcggag gcaattggctc 600
gagctgctgg gattgccgtt cccggggatc gcgatatggc agagcgaatc cctgcagggc 660
ctgcagtacg aagtgttgat ccacgatgtg ccggaaaccc gcagcgcgtt gagcgatacg 720
gcggacatgc agaaagcgct ggcccaacaa gccatcgcac cgttgcgtgc acgcgcgcac 780

ctgttcgtcg gcatccagga gacgcagtgg atgctggaac aggtgggcgc ggactatccc 840
gggctggttg cagaggtcaa caaggccatg ccagcccaac gcacgcgca tgtgttgccg 900
cgactgctgg aagaacgcac cccggtgcgc aacatcaaga gcacccctga gacccctggg 960
gtgtggggac cgaaggaaaa ggatctgctg atgctgaccg agtatgtgcg ctgcgatctc 1020
ggccgctatc ttgcgcacac cgcgaccgca ggcaccggac agctgcctgc ggtgatgctc 1080
gaccacgccg tggaaagtgt gatccggcag tcgattcgcg ccacaccggc cggcaatttc 1140
ctggcgctgc caccggagca ggccaatcag cttgtcgacc aggtggaaa 1189

```

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Artificial sequence description: primer

<400> 4
 gatccaacag ctggacaacc

20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Artificial sequence description: primer

<400> 5
 aacggaatct tcgacaggcc

20

<210> 6
 <211> 1818
 <212> DNA
 <213> Xanthomonas campestris

<400> 6

```

atggcatacgt cctgtcctcc agttcaccgc catcgacgcg cgcggttggc cgctgccttg 60
ttgcttggtt tgctgcccgt gctgcccgcg catgccaacg ccgctgcggt gccgtggcac 120
tcgcgagct tcaaatacgt tgccgaccgc aaggatctca aggaggtgct gcgagacctg 180
tcgcccagcc aatccatcac cacctggatt tcaccggagg tgaccggcac gctcagtggtc 240
aaattcgaag ccactccgca gaagtttctc gacgatctat cgggcacggt cggttttgtc 300
tgggtattacg atggctcggg gctcagaatc tggggcgcgga acgagaccaa gaatgcgacc 360
ttgagtttgg gcgctgcac gacgagtgcg ctgcccgatg cgcttgccgc catgcccgtg 420
gacgatccgc gctttccggt ccgttatgac gagacagcgc acctggcggg ggtgtcgggc 480
ccgcccgggtt atgtggatac cgtcgcggcg atcgccaagc aggtcagaca ggtcgcgcgc 540
caacgcgacg ccaccgaagt gcaggtgttt cagctgcatt atgcgcaggc ggccgaccac 600
accacccgca tcggtgggtca agacatccag gtgcccggga tggccagcct gtcgcgcaac 660
atatacggcg tgcgtggcg gcacttcgc gcgctgcccg ggccaggcgc gaatttcggg 720
cgtgtgcaac cgatcggcg tggctcgtcc aataccttcg gcaacagcgg tcagcgccag 780
agtggcgga gcggcattct cggtttgcc gcgtcgtggt tcggcgctgg gtcgcgctcc 840
gagcgggtgc cggtcagtc gccgttgccg ggcagtgga atagcgccaa tgcgcccggc 900
agcgtgtggc cggagatgag ccaggccaga cgcgatgcgc cgctggcggt ggacgcccgc 960
agcggcggtg agctggcatc cgacgcggcg gtgatcgaag ccgacccgcg caccaacggc 1020
attctcattc gcgacggccc cgagcggatg gccgcctatg gcacgttgat ccagcagctc 1080
gacaaccgtc ccaagctgct gcagatcgat gccaccatca tcgagatccg cgacggcgcc 1140
ctgcaggatc tcggcggtga ctggcggttc cacagccggc gtgtggatgt gcagaccggc 1200

```

```

gacggcggtg gtggccagct tggctacgat ggcagcttga gcggtgcagc agccgcccgt 1260
gcagccgcgc cgttggcggt gacgttgacc gctgtcctgg gcgatgcagg gcgttacctg 1320
atgacgcgcg tctcggcgct cgagcagacc aacaaggcca agatcgtctc caccgcccag 1380
gtggcgacgc tggacaacgt ggaagcggtg atggaccaca agcaacaggc attcgtcgt 1440
gtcagcggtt atgcatccgc cgactctac aacctgtccg cgggtgtatc gctacgcgt 1500
ttgccaagtg tggcgccggg gtgcgcaaat ggtcagatgc gcctggatgt gcgtatcgaa 1560
gacggcgagt tgggcgcca taccgtcgat ggcattcccg tcatcacctc cagcagatc 1620
accacgcagg ctttcgtcaa cgaggccag agcctgctga tcgcccgtta tgctccgac 1680
accgatcaga cagatctgaa caacgtcccc gggctgtcca ggattccatt ggtcggcaac 1740
ctgttcaagc atcgccagca gagcggtcg cggttgagc ggttgttctt gctgacccc 1800
catatcgtct cgccctga 1818

```

<210> 7
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> *Xanthomonas campestris*

```

<400> 7
atgcgtcttt ggctgaggtc cacaccgga gcggtcggcc ttgactgcga ggtcatccca 60
cgcgaggcat tggcctgtgt gctggaactg gacgcagcgg gtgcacagg gcacgcgcgt 120
tgccgcgagg cgctggcgga cgcagcagc cgtgcgcagg cgctgctcga cgctgcccga 180
cggcaggccg agggccatct tcaggatgcc cagcagagg ccgagcgag tgacgcctg 240
ggctatgccg ccgggctgcg ccgtcagctc gacgcgtgga acgagcgcg cgtgcggcat 300
gccttcgcgg ccaggacgc cgacggcg gcctggccga gatcgtcgcg 360
cacgcctgcg agcaggttct gcacgggcac gatcctgcgg cgctgtacgc gcgcgcgca 420
caggcgctgg acggcgccct ggacgaggcg aacgcccctg aggtgagcgt gcatcccgat 480
gcgctggacg atgcacggcg cgcttcgat gcggccgag cggccggcg atggagcatg 540
ccggtggaac tgtgcgggtg tacgactctg gccttgggtg cctgcgtgtg cgaatgggat 600
accggcgtgt tcgagaccga tctgcgtgat cagctgcgca gtctccggcg cgtcatctcg 660
cgctgttgg ccacgcgcga ggcgggtgcc gatgcttgc ga 702

```


(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
28 décembre 2000 (28.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/78967 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 15/31,
C12P 19/06, C07K 14/21, C12N 1/21 // (C12N 1/21,
C12R 1:64)

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01725

(22) Date de dépôt international: 21 juin 2000 (21.06.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/07963 22 juin 1999 (22.06.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): RHO-
DIA CHIMIE [FR/FR]; 25, quai Paul Doumer, F-92408
Coubevoie Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): PIER-
RARD, Jérôme [FR/FR]; 3, rue Hector-Berlioz, F-69009
Lyon (FR). SIMON, Jean-Luc [FR/FR]; 4, route de
Limoges, F-79500 Melle (FR). CHEVALLEREAU,
Paule [FR/FR]; Rue Eloi Ricard, F-79500 Melle (FR).

(74) Mandataire: JACOBSON, Claude; Cabinet Lavoix, 2,
place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 00/78967 A1

(54) Title: AVIRULENT XANTHOMONAS-CAMPESTRIS STRAINS PRODUCING XANTHAN

(54) Titre: SOUCHES AVIRULENTES DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS, PRODUISANT DU XANTHANE

(57) Abstract: The invention concerns a bacterial strain which has lost its phytopathogenic character by inactivation of at least one virulence gene and preserved its capacity for producing exopolysaccharide.

(57) Abrégé: Cette invention concerne une souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

SOUCHES AVIRULENTES DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*, PRODUISANT DU XANTHANE

L'invention a pour objet de nouvelles souches bactériennes, notamment de *Xanthomonas*, en particulier *Xanthomonas campestris* ayant perdu le caractère phytopathogène mais ayant sensiblement conservé la capacité de production d'exopolysaccharide, notamment de gomme xanthane.

5 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* est une bactérie Gram-négative phytopathogène des Crucifères utilisée pour la production industrielle de gomme xanthane (Martin, 1994, Res. Microbiol. 145 :9 93-97).

L'importance économique de cet exopolysaccharide a suscité de nombreuses études sur les gènes impliqués dans cette synthèse (Martin, 10 1994, précité).

De nombreux déterminants de la pathogénicité ont été décrits (Dow et Daniels, 1994, In Bacterial pathogenesis of plants and animals, JL Dangi, ed. Springer Verlag, Heidelberg). Parmi eux, se trouvent des enzymes extracellulaires à activité hydrolytique sur les tissus végétaux. Lorsque le système de sécrétion responsable de l'export de ces enzymes est inactivé, les 15 souches de *X. campestris* ont un phénotype non phytopathogène associé à des symptômes des plantes très réduits (Dow et Daniels, 1994, précité). Parmi les déterminants de la pathogénicité décrits se trouve l'exopolysaccharide, qui semble avoir un rôle dans la phase précoce de la maladie (Dow et Daniels, 20 1994, précité ; Katzen *et al.*, 1998, J. Bacteriol. 180 : 1607-1617). De même, un gène *hrpXc*, décrit chez *X. campestris* pv. *campestris* (Kamoun *et al.*, 1992, Mol. Plant Microbe Interact. 5 : 22-33), est impliqué dans la suppression des réponses de défense de la plante hôte compatible, puisque sa mutation entraîne une réaction nécrotique caractéristique (réponse d'hypersensibilité, 25 HR). Les gènes d'avirulence décrits chez les différents pathovars de *X. campestris* sont aussi impliqués dans la pathogénicité de la bactérie puisqu'ils sont reconnus par la plante possédant le gène de résistance correspondant et conduisent à une réaction HR (Dow et Daniels, 1994, précité ; Yang *et al.*, 1995, Mol. Plant Microbe Interact. 8 : 627-631). Parmi les autres gènes 30 impliqués dans la pathogénicité des *Xanthomonas* (Dow et Daniels, 1994, précité), ont été décrits deux gènes chez *X. campestris* pv *campestris* dont des mutations conduisent à une pathogénicité réduite sans modifications des niveaux d'accumulation d'enzymes extracellulaires et d'exopolysaccharides

(Osbourn *et al.*, 1990, Mol. Plant Microbe Interact. 3 : 280-285). D'autres déterminants de la pathogénicité sont constitués par différents jeux indépendants de gènes régulateurs de la synthèse des enzymes extracellulaires et de l'exopolysaccharide parmi lesquels on trouve : les gènes *rpfA* à *H*, dont des mutations conduisent à une réduction de la production d'exopolysaccharide ; *rpfN*, un represser de la synthèse de ces enzymes et de l'exopolysaccharide ; *clp*, dont des mutations conduisent à une pathogénicité réduite et à une moindre production d'exopolysaccharides (Dow et Daniels, 1994, précité). Enfin, d'autres déterminants de la pathogénicité sont constitué par les gènes *hrp*.

Les gène *hrp* (réaction d'hypersensibilité et pathogénicité) sont essentiels pour la pathogénicité sur plante compatible et pour la réaction d'hypersensibilité sur les hôtes résistants (Alfano et Collmer, 1997, J. Bacteriol. 179 : 5655-5662). Ils ont été clonés et caractérisés à des degrés divers chez plusieurs bactéries phytopathogènes des genres *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* et *Xanthomonas* où ils sont relativement conservés (Zurek et Bukowski, 1998, Acta Microbiologica Polonica, 47 : 227-241 ; Alfano et Collmer, précité), en particulier chez *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Huguet *et al.*, 1998, Molec. Microbiol 29 : 1379-1390 ; Fenselau *et al.*, 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396 ; Bonas, 1994, précité). Les plus conservés d'entre eux ont d'ailleurs été renommés gènes *hrc* (Bogdanove *et al.*, 1996, Mol. Microbiol., 20 : 681-683). Parmi les fonctions des gènes *hrp* décrites à ce jour se trouvent la régulation de leur expression, la production de protéines élicitrices de la réponse de l'hôte, la constitution d'un système de sécrétion spécifique (dit de type III) et la synthèse de glucanes periplasmiques (Zurek et Bukowski, 1998, Acta Microbiologica Polonica, 47 : 227-241 ; Mudgett et Staskawicz, 1998, Current Opinion in Microbiology 1 : 109-114 ; Lindgren, 1997, Annu Rev. Phytopathol. 35 :129-152 ; Alfano et Collmer, 1997, précité ; Bonas, 1994, précité). Un ensemble de gènes *hrp* a été cloné chez *X. campestris* pv. *campestris* (Arlat *et al.*, 1991, Mol. Plant Microbe Interact 4 : 593-601) mais non séquencé. Il est aussi rapporté que les souches porteuses de mutations dans ces gènes réalisées à l'aide d'un transposon auraient une production normale d'exopolysaccharide d'après l'aspect des colonies sur

boite. Aucune quantification plus précise de la productivité de xanthane de ces souches n'a toutefois été publiée.

En outre, les mutations réalisées chez ces souches ne possèdent pas un caractère de stabilité suffisant pour une utilisation industrielle pour la production de gomme xanthane. En effet, le transposon utilisé contient le gène codant pour la transposase (Simon *et al.*, 1989, Gene 80 : 161-169) ce qui n'exclue pas un événement d'excision du transposon à une fréquence pouvant être estimée entre 10^{-6} et 10^{-3} par génération (Berg *et al.*, 1989, In Berg and Howe ed., Mobile DNA, American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 879-926 ; Craig, In *Escherichia coli* and *Salmonella*, Neidhardt ed., ASM Press, Washington, D.C. pp 2339-2362). De plus, le transposon utilisé contient un gène de résistance aux antibiotiques néomycine et kanamycine. Enfin, le transposon inséré dans le génome de ces souches constitue un élément d'ADN non homologue puisque celui-ci n'est pas un élément naturel du génome de la souche utilisée.

Bien qu'il n'existe pas de réglementation spécifique à l'heure actuelle en Europe imposée par le caractère phytopathogène de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, il est hautement souhaitable, pour des raisons liées à l'environnement, d'utiliser des souches de *Xanthomonas campestris* non phytopathogènes, afin de diminuer le risque éventuel de contamination de cultures d'intérêt agronomique à proximité du site. La sélection d'une telle souche par les techniques classiques de mutagenèse aléatoire de production est un processus long et fastidieux puisqu'il doit faire intervenir un criblage à haute capacité permettant d'isoler une souche non phytopathogène mais ayant conservé ses caractéristiques de productivité, c'est-à-dire sans mutations secondaires.

Par ailleurs, l'utilisation d'une souche génétiquement modifiée produisant une gomme xanthane modifiée (telle que décrite dans US 5,514,791) ou ayant une productivité améliorée est soumise à une réglementation stricte (Theilleux 1998, Dictionnaire permanent Bioéthique et Biotechnologies, ed Législatives, pp 1595-1648). Celle-ci impose notamment pour une construction réalisée dans une souche présentant un danger pour les plantes, d'adopter des mesures de confinement sévères sur le site de

production. Les investissements nécessaires auraient alors des conséquences économiques négatives.

Il existe par conséquent un besoin de disposer d'une souche industrielle de *X. campestris* stablement dépourvue de caractère phytopathogène mais ayant retenu ses propriétés de productivité de gomme xanthane. De plus, pour des raisons réglementaires et afin de simplifier le traitement des déchets issus de la séparation de la gomme xanthane de la biomasse, il est utile que la souche ne contienne pas de gène hétérologue codant pour une résistance à un antibiotique. Enfin, au regard des législations française et européenne, il est préférable que la souche obtenue ait été construite par autoclone, ce qui signifie qu'elle ne contienne pas d'éléments d'ADN étranger à son patrimoine génétique naturel.

Les travaux des inventeurs ont permis la construction d'une souche de *X. campestris* possédant les propriétés requises.

De manière surprenante, il a été montré grâce à l'invention qu'une bactérie devenue non phytopathogène de manière stable, par délétion d'un fragment de taille importante affectant plusieurs kilobases de gènes impliqués dans la virulence, était néanmoins capable de produire de la gomme xanthane.

De manière plus surprenante encore, la souche modifiée de l'invention produit de la gomme xanthane en une quantité et une qualité en tous points comparables à celle produite par la souche sauvage à partir de laquelle la construction a été réalisée.

L'invention a pour objet une souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

La souche bactérienne selon l'invention est avantageusement rendue stablement non phytopathogène par délétion d'au moins un gène, avantageusement au moins deux gènes, de préférence au moins trois gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et de préférence 5 à 9 gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

Par "stablement dépourvue de caractère phytopathogène", on entend que ce caractère est conservé après un nombre de cycles cellulaires

d'au moins 20 générations, avantageusement d'au moins 30 générations, de préférence d'au moins 40 générations.

Parmi les bactéries ayant perdu leur caractère phytopathogène et avantageusement utilisables pour une production industrielle d'exopolysaccharide, on peut citer en particulier les genres suivants : *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* et *Xanthomonas*.

L'invention a notamment pour objet une souche *Xanthomonas* essentiellement dépourvue de caractère phytopathogène de manière stable et ayant conservé sensiblement la capacité de production d'exopolysaccharide.

Par "essentiellement non phytopathogène", on entend l'absence de lésions et/ou flétrissures envahissantes sur des feuilles de plantes hôtes crucifères, notamment le chou (*Brassica oleracea*), après au moins 15 jours suivant l'inoculation de la feuille par blessure de la nervure centrale.

Avantageusement, la souche *Xanthomonas* est de l'espèce *campestris*, en particulier *pv campestris*.

L'inactivation du(des)dit(s) gène(s) est obtenue de préférence par une délétion d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, de préférence 9 kb et pouvant aller jusqu'à 40 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

Dans un mode de réalisation préféré, la souche de *Xanthomonas*, notamment *campestris* essentiellement non phytopathogène selon l'invention est obtenue par délétion des gènes *hrpA1* à *hrpC2* d'une souche sauvage phytopathogène de *Xanthomonas campestris pv campestris*.

La gomme xanthane produit par les souches de *Xanthomonas* de l'invention est une gomme xanthane sensiblement identique à celle produite par l'espèce sauvage, à savoir qu'elle présente sensiblement la même distribution de poids moléculaire, ainsi que le même degré de modifications, notamment des degrés d'acétylation et de pyruvylation.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'une souche telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'elle est obtenue

par recombinaison homologue avec un plasmide comprenant une délétion de tout ou partie des gènes *hrp* ou *hrc*.

L'invention a en outre pour objet un procédé de préparation d'exopolysaccharide bactérien, notamment de gomme xanthane, caractérisé en ce que l'on cultive une souche bactérienne, le cas échéant, du genre *Xanthomonas*, de préférence de l'espèce *Xanthomonas campestris* telle que définie ci-dessus, dans des conditions permettant la production d'exopolysaccharide dans le milieu de fermentation.

Les exemples qui suivent illustrent la construction de souches de *Xanthomonas campestris* répondant aux caractéristiques de l'invention.

Dans ces exemples, la construction a été réalisée à partir d'une souche de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* obtenue par criblage de gomme xanthane.

Il va de soi que d'autres souches de *Xanthomonas* et également de bactéries productrices d'exopolysaccharide appartenant à un genre différent accessibles à l'homme du métier peuvent être utilisées comme matière première de départ pour réaliser des souches non phytopathogènes, conformément aux connaissances générales du domaine technique en question et aux indications données ci-après, notamment en se référant aux parties de séquences rapportées dans le cas où la souche appartient à l'espèce *Xanthomonas campestris*.

Pour leur compréhension, on se reportera aux figures annexées sur lesquelles :

- la figure 1 schématise la stratégie de construction de dérivés de la souche de *X. campestris* RPA-BIOCAT826 porteurs d'une délétion de gènes *hrp*.

L'organisation des gènes *hrp* chez *X. campestris* pv *vesicatoria* est décrite par Fenselau et Bonas (1995, Mol. Plant Microbe Interact. 8 (6),

845-854) et par Fenselau *et al.*, (1992, Mol. Plant Microbe Interact. 5, 390-396) et est disponible en partie dans Genbank sous le numéro d'accès U33548. Les régions homologues clonées à partir de la souche RPA-BIOCAT826 sont représentées ainsi que le nom des plasmides dans lesquels elles ont été clonées. La carte de restriction de la région *hrp* de *X. campestris* pv *campestris* est publiée par Arlat *et al.*, 1991, Mol. Plant Microbe Interact 4:593-601, et est complétée par les résultats présentés dans les exemples 1 à 4. La délétion $\Delta hrpA1-C2$ portée par le plasmide pRPA-BCAT140 décrit dans les exemples a été introduite dans le génome par double recombinaison
homologue ;

- la figure 2 représente les signaux d'hybridation obtenus en Southern Blot avec la sonde HRPB5 décrite ci-dessous et les ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 et de deux dérivés de cette souche ayant intégré la délétion $\Delta hrpA1-C2$. La position des bandes du marqueur de taille a été rapportée par comparaison avec la distance de migration sur le gel coloré au bromure d'éthidium avant transfert. Ces tailles sont exprimées en kilobases.

- la figure 3 représente les signaux d'hybridation obtenus en Southern Blot avec la sonde HRPC2 décrite ci-dessous et les ADN génomiques de la souche RPA-BIOCAT826 et de 5 dérivés de cette souche ayant intégré la délétion $\Delta hrpA1-C2$. La position des bandes du marqueur de taille a été rapportée par comparaison avec la distance de migration sur le gel coloré au bromure d'éthidium avant transfert. Ces tailles sont exprimées en kilobases.

Matériels et méthodes

Sauf autres précisions, les techniques mises en oeuvre sont des techniques classiques de biologie moléculaire et de microbiologie, connues de l'homme de l'art telles que décrites par exemple par Ausubel *et al.*, 1987 (Current Protocols in Molecular Biology, John Willey and Sons, New York ; Maniatis *et al.*, 1982, Molecular Cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), Coligan *et al.*, 1997 (Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc)..

1. Souche de départ

La souche RPA-BIOCAT826 est issue de la collection de Rhodia Chimie (Usine de Melle, RTAM) et a été sélectionnée pour son aspect morphologique blanc au lieu de l'habituel aspect jaune. Les souches RPA-BIOCAT1016, 1017, 1019 et 1021 ont été déposées à la CBS sous les numéros respectifs CBS 101940, CBS 101941, CBS 101942, CBS 101943 et CBS 101944.

2. Milieu de culture MSX

Le milieu MSX employé pour la culture des *Xanthomonas* contient : 0,2 g/l d'extrait de levure; 1,2 g/l de NH_4NO_3 ; 7,3 g/l de K_2HPO_4 ; 0,25 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/l de glucose et 15 g/l de Bacto-Agar pour le milieu gélosé ; 10 g/l de glucose pour le milieu liquide. Le sulfate de magnésium et le glucose sont stérilisés à part et ajoutés extemporanément. Le pH du milieu est équilibré à pH 7,2 avant stérilisation avec de l'acide sulfurique dilué à 10 %.

Les préparations d'ADN génomique ont été réalisées à partir de jeunes cultures liquides en MSX (OD₆₆₀ inférieure à 0,4). Après centrifugation de 40 ml de culture, le culot cellulaire est repris dans 11,9 ml de tampon TE (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York) et 630 µl de SDS 10 % (Sodium Dodecyl Sulfate) puis 63 µl de Protéinase K à 20 mg/ml sont ajoutés. Après incubation de 1 h à 37°C, 2,1 ml de NaCl 5M sont ajoutés, suivis par 1,7 ml de 10% CTAB dans une solution de NaCl 0,7M et le tout est incubé 10 min à 65°C. Après une première extraction avec un volume équivalent d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) suivie d'une deuxième extraction par un volume équivalent d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1), le surnageant est ajouté à 0,6 volume d'isopropanol. Après centrifugation (5 min à 10 000 tours/min), le culot obtenu est lavé dans de l'éthanol à 70% puis séché avant d'être repris dans au moins 2 ml de TE auxquels est ajouté 25 µl d'une solution de RNase à 5 mg/ml. Après une incubation de 1 h à 37°C, une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique est réalisée et l'ADN du surnageant est

précipité par ajout de 0,1 volume d'Acetate de sodium 3 M et de 2,5 volume d'éthanol. Le culot obtenu après centrifugation de 5 minutes à 14 000 tours/min est lavé à l'éthanol 70%, séché, puis resuspendu dans au moins 0,5 ml de TE.

EXEMPLE 1 :

Clonage de la région *hrpC2* de RPA-BIOCAT826

La région visée a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 en utilisant les amorces XcC2.3 (SEQ ID N°1) et XcC2.4 (SEQ ID N°2). L'ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 a été extrait et utilisé dans une réaction de PCR contenant 100 ng d'ADN génomique, 40 pmole de chaque amorce, 0,2 mM dNTP, 1,25 U de polymérase Pwo (Boehringer Mannheim) dans un volume final de 50 µl du tampon de cette enzyme. Après une incubation de 5 min à 95°C, le mélange a d'abord subi 30 cycles comprenant une incubation de 1 min à 94°C, puis 1 min à une température allant de 63°C à 48°C (par pas de 0,5°C par cycle) et 1 min à 72°C, puis 15 cycles comprenant une incubation de 1 min à 94°C, suivie de 1 min à 48°C et d'une minute à 72°C, et enfin 10 min à 72°C. Le produit d'amplification de taille voisine de 1,2 kb a été purifié par migration sur gel d'agarose puis à l'aide du kit Qiaex (Quiagen). Il a ensuite été cloné dans le vecteur pZERO-1 (Invitrogen BV) ouvert par EcoRV. Après transformation de la souche *E. coli* JM110, un clone hébergeant un plasmide ayant intégré le fragment de 1,2 kb a été retenu. Ce plasmide a été appelé pRPA-BCAT91 et l'insert qu'il contenait a été séquencé (Genome Express, Grenoble, France). La séquence obtenue (SEQ ID N°3) a été alignée avec la séquence du gène *hrpC2* de *X. campestris pv vesicatoria* (Fenselau et al., 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396). Une identité de 87% a été trouvée sur les 1188 bp représentant 61% du gène *hrpC2*. La séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique montre un pourcentage d'identité de 92% par rapport à la portion équivalente de la séquence de la protéine *HrpC2* de *X. campestris pv vesicatoria*.

EXEMPLE 2 :**Clonage de la région HrpA de RPA-BIOCAT826**

5 Cette région a été clonée en criblant une banque partielle génomique de la souche RPA-BIOCAT826 à l'aide d'une sonde nucléotidique correspondant à la région équivalente de la souche *X. campestris pv vesicatoria*. Cette région est disponible dans un plasmide dénommé pL3o qui
10 contient un insert de 6,6 kb EcoRV englobant les gènes *hrpB8* et *hrpA1* de *X. campestris pv vesicatoria* (Fenselau *et al.*, 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396).

La sonde HRP A1 a été préparée par PCR en utilisant les amorces XcvA15 (SEQ ID N°4) et XcvA18 (SEQ ID N°5) à raison de 40 pmole
15 chacune, la matrice plasmidique pL3o (40 ng), 0,2 mM dNTP, 1,25 U de polymérase Pwo (Boehringer Mannheim) dans un volume final de 50 µl du tampon de cette enzyme. Après une incubation de 5 min à 95°C, le mélange a subi 30 cycles comprenant une séquence de 30 secondes à 94°C, 1 min à 55°C et 1,5 min à 72°C. Après une dernière incubation de 10 min à 72°C, le
20 produit d'amplification de 664 bp a été purifié sur gel d'agarose puis par le kit Quiaex (Quiagen).

Environ 10µg d'ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 ont été digérés par 100 unités d'EcoRI pendant 16h à 37°C. La technique classique de Southern Blot a ensuite été employée afin de déterminer la taille
25 du fragment EcoRI hybridant avec la sonde HRP A1 décrite ci-dessus. Après migration sur gel d'agarose de la digestion EcoRI ci-dessus, transfert sur une membrane Hybond N+ (Amersham) par hybridation à 55°C pendant 19h dans une solution aqueuse d'hybridation (0,5 % SDS ; 6% SSC ; 0,25% de lait écrémé en poudre) avec la sonde HRP A1 marquée au phosphore 32 grâce au
30 kit Ready-To-Go (Pharmacia Biotech) selon les indications du fabricant et lavage à 55°C par une solution de 0,2 SSC et 0,1% SDS, la membrane a été mise en autoradiographie pendant 19 h à -80°C. Le développement du film a révélé un signal d'hybridation de taille voisine de 7,3 kb.

Une banque partielle génomique de la souche RPA-BIOCAT826 a donc été réalisée en digérant 100 µg d'ADN génomique de cette souche par 1000 unités de l'enzyme EcoRI pendant 20 h à 37°C. Après migration sur gel d'agarose, la zone correspondante aux fragments de taille comprise entre 7 et 8 kb a été découpée et l'ADN extrait du gel par électroélution dans un boudin de dialyse (membranes Spectra/Por de Spectrum Medical Industries, Inc). Après précipitation à l'éthanol, l'ADN a été ligaturé dans un volume final de 10 µl au vecteur pBlueScript II SK (Stratagene) préalablement ouvert par l'enzyme EcoRI puis dephosphorylé avec la phosphatase alcaline de crevette (United States Biochemicals). Après incubation du mélange de ligation 14h à 16°C, un dixième du mélange a été utilisé pour transformer par électroporation des cellules d'*E. coli* DH5alpha. Environ 3000 transformants ont été analysés par hybridation de colonies transférées sur membrane de nylon en utilisant la sonde HSPA1. Douze colonies donnant un signal d'hybridation positif ont été purifiées sur milieu gélosé LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Les plasmides de douze colonies purifiées ont été extraits et des digestions EcoRI des ces plasmides ont été analysées par Southern blot avec la sonde HSPA1 pour confirmer la présence d'un fragment d'environ 7,3 kb hybridant avec cette sonde. Après une analyse de restriction avec diverses enzymes, un fragment de 2,7 kb SacII et un fragment de 1,6 kb SacII ont été sous-clonés dans le vecteur pBlueScript II SK ouvert par SacII pour donner respectivement les vecteurs pRPA-BCAT135 et pRPA-BCAT134. Le séquençage partiel de ces deux vecteurs a été réalisé (Genome Express, Grenoble) et a révélé la présence d'une phase ouverte de lecture de 1818 bp (SEQ ID N°6) dont la séquence peptidique déduite présente 85% d'identité avec la protéine HrpA1 de *X. campestris pv vesicatoria* (Fenselau *et al.*, 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396).

EXEMPLE 3 :

Construction de souches dérivées de RPA-BIOCAT826 contenant une délétion $\Delta hrpA1-C2$

La délétion $\Delta hrpA1-C2$ a été construite *in vitro* en clonant dans le plasmide pJQ200SK (Quandt et Hynes, 1993, Gene 127 : 15-21) un fragment de pRPA-BCAT134 et un fragment de pRPA-BCAT91 (cf figure 1). Le plasmide pRPA-BCAT91 a été ouvert par NcoI puis traité à la polymérase I (fragment de Klenow) pendant 15 min à 30°C en présence de 25µM de dNTP. Après extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique puis précipitation à l'éthanol, l'échantillon a été repris dans 40 µl d'eau pour être traité par 20 unités de XbaI à 37°C puis et 20 unités d'ApoI à 50°C. Le fragment d'environ 1,2 kb a alors été séparé sur gel et récupéré avec le kit Quiex II (Quiagen). Le fragment d'environ 1,3 kb RsaI-SacII de pBCAT134 a été purifié de façon identique. Ces deux fragments ont été ligaturés au vecteur pBlueScript II SK ouvert par les enzymes SacII et XbaI pour donner le plasmide pRPA-BCAT139. Un fragment SacI-XbaI d'environ 2,5 kb porteur de la délétion $\Delta hrpA1-C2$ a alors pu être extrait de ce plasmide pour être cloné dans le plasmide pJQ200KS ouvert par les enzymes SacI et XbaI. Le plasmide résultant a été nommé pRPA-BCAT140. C'est un plasmide non réplcatif chez *X. campestris*, porteur du marqueur de résistance à la gentamycine permettant de sélectionner les clones de *X. campestris* ayant intégré le plasmide par recombinaison homologue et porteur du marqueur de sélection positive sacB qui permet de sélectionner les clones ayant éliminé le marqueur de résistance à la gentamycine suite à un deuxième événement de recombinaison homologue.

Le plasmide pRPA-BCAT140 a été introduit dans la souche RPA-BIOCAT826 par conjugaison. Pour ce faire, ont été mélangés sur milieu gélosé MSX 40 µl d'une culture en phase exponentielle de la souche DH5alpha hébergeant pRPA-BCAT140, 40 µl d'une culture en phase exponentielle de la souche HB101 hébergeant le plasmide pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 7347-7351) et 40 µl d'une culture de la souche RPA-BIOCAT826 en phase exponentielle dans un milieu MSX. Après incubation pendant 24h à 30°C, les clones de *X. campestris* ayant intégré le plasmide pRPA-BCAT140 ont été purifiés deux fois de suite sur un milieu gélosé MSX contenant 15 µg/ml de gentamycine. Huit clones ont ensuite été étalés sur une surface d'environ 1 cm² sur un milieu gélosé MSX

contenant 5% de sucrose. Après une incubation de 72h à 30°C, des colonies ont été isolées par deux purifications successives sur milieu gélosé MSX. Environ 300 colonies ont ensuite été repiquées sur milieu gélosé MSX contenant 15 µg/ml de gentamycine afin d'identifier les clones sensibles à la gentamycine (de 90 à 100 % des clones en fonction des essais). Une quarantaine de ces clones ont ensuite été analysés par Southern Blot en utilisant une digestion EcoRI-BamHI de leur ADN génomique et la sonde HRP A1. Environ 25 % des clones présentaient un signal différent de celui de la souche sauvage RPA-BIOCAT826 et cohérent avec l'intégration de la délétion $\Delta hrpA1-C2$. Cinq clones ont été retenus pour la suite des expériences : souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021, 1022.

EXEMPLE 4 :

Caractérisation par Southern Blot des souches dérivées de RPA-BIOCAT826 contenant une délétion $\Delta hrpA1-C2$

Les souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021 et 1022 ont été caractérisées en analysant les profils d'hybridation de digestions d'ADN génomique EcoRI, BamHI et EcoRI-BamHI avec les sondes HRP3'A1, HRPB5 et HRPC2.

La sonde HRP3'A1 a été obtenue en purifiant le fragment de 1,6 kb SacII du plasmide pRPA-BCAT134 par migration sur gel et utilisation du kit Quiaex.

La sonde HRPC2 a été obtenue en purifiant le fragment de 1,2 kb EcoRI-XbaI du plasmide pRPA-BCAT91 par migration sur gel et utilisation du kit Quiaex.

La sonde HRPB5 a été obtenue en purifiant le fragment de 1,5 kb BamHI du plasmide pRPA-BCAT129 par migration sur gel et utilisation du kit Quiaex. Le séquençage de cet insert a révélé notamment une phase ouverte de lecture (SEQ ID n°7) dont la séquence peptidique déduite présente 77% d'identité avec la protéine HrpB5 de *X. campestris pv vesicatoria* (Fenselau et al., 1995, Mol. Plant-Microbe Interactions, 8 : 845-854). Le plasmide pRPA-

BCAT129 a été obtenu en clonant les fragments BamHI d'ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 de taille comprise entre 1,3 et 1,9 kb dans le vecteur pBlueScriptII SK et en criblant les colonies avec une sonde HRPB de manière analogue à celle décrite dans l'exemple 2. La sonde HRPB a été obtenue par PCR en utilisant les amorces RST2 et RST3 (Leite *et al.*, 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60 : 1068-1077) et la matrice plasmidique pB10g (U. Bonas, communication personnelle). Le plasmide pB10g correspond au plasmide pBluescriptKS dans lequel est cloné le fragment de 7,3 kb BamHI contenant la région *hrpB* et le gène *hrpA1* de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (Fenselau *et al.*, 1995, Mol. Plant-Microbe Interactions, 8 : 845-854). La réaction de PCR a été réalisée avec 40 pmole de chaque amorce, 50 ng de pB10g, 0,2 mM dNTP, 1,25 U de polymérase Pwo (Boehringer Mannheim) dans un volume final de 50 µl du tampon de cette enzyme. Après une incubation de 5 min à 95°C, le mélange a d'abord subi 24 cycles comprenant une incubation de 30 secondes à 95°C, puis 40 secondes à une température allant de 70°C à 63°C (par pas de 0,3°C par cycle) et 1 min à 72°C, puis 6 cycles comprenant une incubation de 30 secondes à 95°C, suivie de 40 secondes à 63°C et d'une minute à 72°C, et enfin 5 min à 72°C. Le fragment d'environ 840 bp a ensuite été purifié sur gel d'agarose et à l'aide du kit Quiaex (Quiagen).

L'analyse en Southern Blot a été réalisée en marquant les sondes à l'aide du kit « Megaprime DNA labelling system » (Amersham) selon les instructions fournies. Après migration sur gel d'agarose, les digestions d'ADN génomiques ont été transférées sur membranes Hybond N+ (Amersham) selon les indications fournies, puis incubées dans la solution d'hybridation composée d'un tampon phosphate 0,5M et de SDS 7% (115 ml de Na₂HPO₄ 1M, 84,6 ml de NaH₂PO₄ M, 200 ml H₂O, 28 g SDS). Les sondes marquées sont incubées 5 min à 100 °C, puis 5 min à température ambiante avant d'être diluées dans 12 ml de solution d'hybridation et incubées 5 min à 100°C. Ce mélange est alors mis au contact des membranes pendant 6 à 20 h à 65°C. Celles-ci sont ensuite lavées 10 à 15 minutes dans un tampon phosphate 0,1 M contenant 1% de SDS (42,3 ml Na₂HPO₄ 1M, 57,7 ml NaH₂PO₄ 1M, 900 ml H₂O, 10 g SDS) puis mis en exposition.

Les résultats obtenus avec la sonde HRPB5 (figure 2) montrent, pour la souche RPA-BIOCAT826, un signal d'hybridation à environ 4,8 kb avec la digestion EcoRI et un signal à 1,6 kb avec la digestion BamHI et la digestion EcoRI-BamHI. Ces résultats sont en accord avec la cartographie de Arlat *et al.* (Molecular Plant-Microbe Interactions, 1991, 4 : 593-601) et la localisation du gène *hrpB5* décrit ci-dessus. Aucune des souches RPA-BIOCAT étudiées ne montre de signal d'hybridation avec HRPB5, ce qui est cohérent avec l'intégration de la délétion $\Delta hrpA1-C2$ dans le génome de ces souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021 et 1022 (La figure 2 ne montre que le résultat d'hybridation obtenu avec les souches RPA-BIOCAT).

Les résultats obtenus avec la sonde HRPC2 (figure 3) montrent, pour la souche RPA-BIOCAT826, un signal d'hybridation à environ 5,5 kb avec les digestions EcoRI et un signal à environ 2,6 kb avec la digestion EcoRI-BamHI. Ces résultats sont en accord avec la cartographie de Arlat *et al.* (Molecular Plant-Microbe Interactions, 1991, 4 : 593-601), l'organisation des gènes *hrp* chez *X. campestris pv vesicatoria* (Fenselau *et al.*, 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396) et la localisation du gène *hrpB5* décrit ci-dessus. Les résultats obtenus avec les souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021 montrent un signal entre 7 et 8 kb avec les digestions BamHI et un signal à 4,4 kb avec les digestions EcoRI-BamHI. Compte tenu de la cartographie présentée dans la figure 1, ces résultats sont cohérents avec l'intégration de la délétion $\Delta hrpA1-C2$ dans le génome des souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021 et 1022.

Enfin, les résultats obtenus avec la sonde HRP3'A1 montrent, pour la souche RPA-BIOCAT826, un signal d'hybridation à 7,3 kb environ pour la digestion EcoRI-BamHI. Avec les souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021, ce signal d'hybridation est à 4,4 kb, ce qui est cohérent avec l'intégration de la délétion $\Delta hrpA1-C2$ dans le génome des ces souches.

EXEMPLE 5 :**Virulence des souches dérivées de RPA-BIOCAT826
contenant une délétion HrpA1-C2**

Les tests de virulence ont été effectués sur des plants de choux (*Brassica oleracea* var. *captiva* cultivar *Siria*) dont les semences ont été obtenues auprès de Clause Semences (av. Lucien Clause, 91221 Brétigny-sur-Orge, France). Les plantes ont été cultivées en cellule climatique selon les paramètres suivants : 14 heures à 25°C, 55% d'humidité, intensité lumineuse saturante (4000 W/m); 10 heures à 25°C, 60% d'humidité. Elles ont été infectées au stade 2 feuilles soit environ 13 jours après semis. Pour chaque souche testée, 8 plants ont été utilisés en perçant la première feuille dans la nervure centrale de la partie terminale à l'aide d'un cure-dent infecté. La contamination du cure-dent a été réalisée en immergeant sa pointe dans une culture de la souche étudiée de 2 jours en milieu MSX (environ 10⁸ bactéries/ml). Les contrôles négatifs étaient constitués par un mélange de souches de *X. campestris* pv *vesicatoria* (souche B229RI = RPA-BIOCAT381 et souche B230RII = RPA-BIOCAT382), phytopathogènes de référence sur piments isolées chez Clause Semences. Les contrôles positifs étaient constitués par un mélange de souches de *X. campestris* pv *campestris* (souche 2963 = RPA-BIOCAT379 et souche 63C2AM = RPA-BIOCAT380), phytopathogènes de référence sur choux isolées chez Clause Semences. Les symptômes (lésions jaunes en forme de V) ont été lus et mesurés 12 et 14 jours après infection. Pour chaque plante, une note a été donnée selon la correspondance suivante : 0, aucun symptôme ; 1, dépigmentation localisée à proximité du point d'infection ; 2, nécrose inférieure à 0,5 cm² ; 3, nécrose de 0,5 à 1,5 cm² ; 4, nécrose supérieure à 1,5 cm² ; 5, nécrose généralisée de la feuille. La somme des notes des 8 plantes infectées avec la même souche est la note de pathogénicité de cette souche (Tableau 1).

Tabl au 1 : Phytopatogénicité d s souches de *Xanthomonas*

SOUCHES	J + 12	J + 14
BIOCAT 381/382	0	0
BIOCAT 379/380	32	39
BIOCAT826	28	34
BIOCAT 1016	4	4
BIOCAT 1017	5	5
BIOCAT 1019	2	3
BIOCAT 1021	1	1
BIOCAT 1022	4	5

Alors que la souche RPA-BIOCAT826 provoque le flétrissement progressif de la feuille, les souches construites provoquent au maximum un flétrissement nécrotique localisé, ce qui traduit une absence de pathogénicité.

EXEMPLE 6 :

Production de xanthane par les souches dérivées de RPA-BIOCAT826 contenant une délétion HrpA1-C2

La productivité de xanthane des souches a été évaluée en mesurant la matière sèche précipitable à l'isopropanol contenu dans 40 ml de culture. Après 24 heures de préculture en MSX, 100 ml de milieu MSX en fioles erlenmeyers de 500 ml ont été inoculés avec approximativement le même nombre de bactéries (0,4 ml de préculture de OD660 = 0,25). Après 6 jours d'incubation à 30°C sous agitation (200 tours/min), 40 grammes de cultures ont été prélevés et mélangés à 150 ml d'isopropanol. Après filtration, les fibres récupérées ont été lavées deux fois par 70 ml d'isopropanol avant d'être séchées puis pesées en sortie d'étuve. L'opération réalisée sur trois cultures indépendantes de la souche RPA-BIOCAT826 a montré une variabilité de la productivité de l'ordre de 10 %. Les résultats obtenus avec la souche

RPA-BIOCAT826 et ses dérivées $\Delta hrpA1-C2$ sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Productivité de xanthane de RPA-BIOCAT826 et de ses dérivés $\Delta hrpA1-C2$.

SOUCHE	POIDS SEC Xt (g)	PRODUCTIVITE (g/g)
BIOCAT826	0,323	$8,1 \times 10^{-3}$
BIOCAT 1016	0,362	$9,0 \times 10^{-3}$
BIOCAT 1017	0,366	$9,1 \times 10^{-3}$
BIOCAT 1019	0,371	$9,3 \times 10^{-3}$
BIOCAT 1021	0,334	$8,4 \times 10^{-3}$
BIOCAT 1022	0,329	$8,2 \times 10^{-3}$

Les productivités sont exprimées en grammes de matière sèche extractible à l'isopropanol par grammes de culture.

REVENDEICATIONS

1. Souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité
5 de production d'exopolysaccharide.

2. Souche bactérienne selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a été rendue stablement non phytopathogène par inactivation d'au moins un gène, avantageusement au moins deux gènes, de préférence au
10 moins trois gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

3. Souche bactérienne selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle a été rendue stablement non phytopathogène par inactivation de 5 à 9 gènes du groupe de gènes *hrp* ou
15 *hrc*.

4. Souche bactérienne selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une souche *Xanthomonas* ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant
20 conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

5. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est de l'espèce *Xanthomonas campestris*.

25 6. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de *Xanthomonas campestris pv campestris*.

7. Souche *Xanthomonas* selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'inactivation du ou
30 desdit(s) gène(s) est obtenue par délétion d'une région d'ADN d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et en ce qu'elle conserve la capacité de produire de l'exopolysaccharide.

8. Souche *Xanthomonas* selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend une délétion d'une région d'ADN d'au plus 40 kb.

9. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par délétion de tout ou partie des gènes *hrp A1* à *hrpC2*.

10. Souche *Xanthomonas* essentiellement non phytopathogène, caractérisée en ce qu'elle comprend une délétion d'une région d'ADN d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et en ce qu'elle conserve la capacité de produire de l'exopolysaccharide.

11. Souche *Xanthomonas* essentiellement non phytopathogène, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par délétion de tout ou partie des gènes *hrp A1-C2*.

12. Souches *Xanthomonas campestris* essentiellement non phytopathogènes choisies parmi les souches BIOCAT 1016, BIOCAT 1017, BIOCAT 1019, BIOCAT 1021 et BIOCAT 1022, déposées à la CBS respectivement sous les numéros CBS 101940, CBS 101941, CBS 101942, CBS 101943 et CBS 101944.

13. Souche *Xanthomonas* selon l'une des revendications 4 à 13, caractérisée en ce que l'exopolysaccharide est une gomme xanthane.

14. Plasmide pRPA-BCAT 140 utilisé pour la fabrication de la souche selon les revendications 9 à 13.

15. Procédé de préparation d'une souche selon l'une quelconque des revendications 7 à 13, caractérisé en ce qu'elle est obtenue par

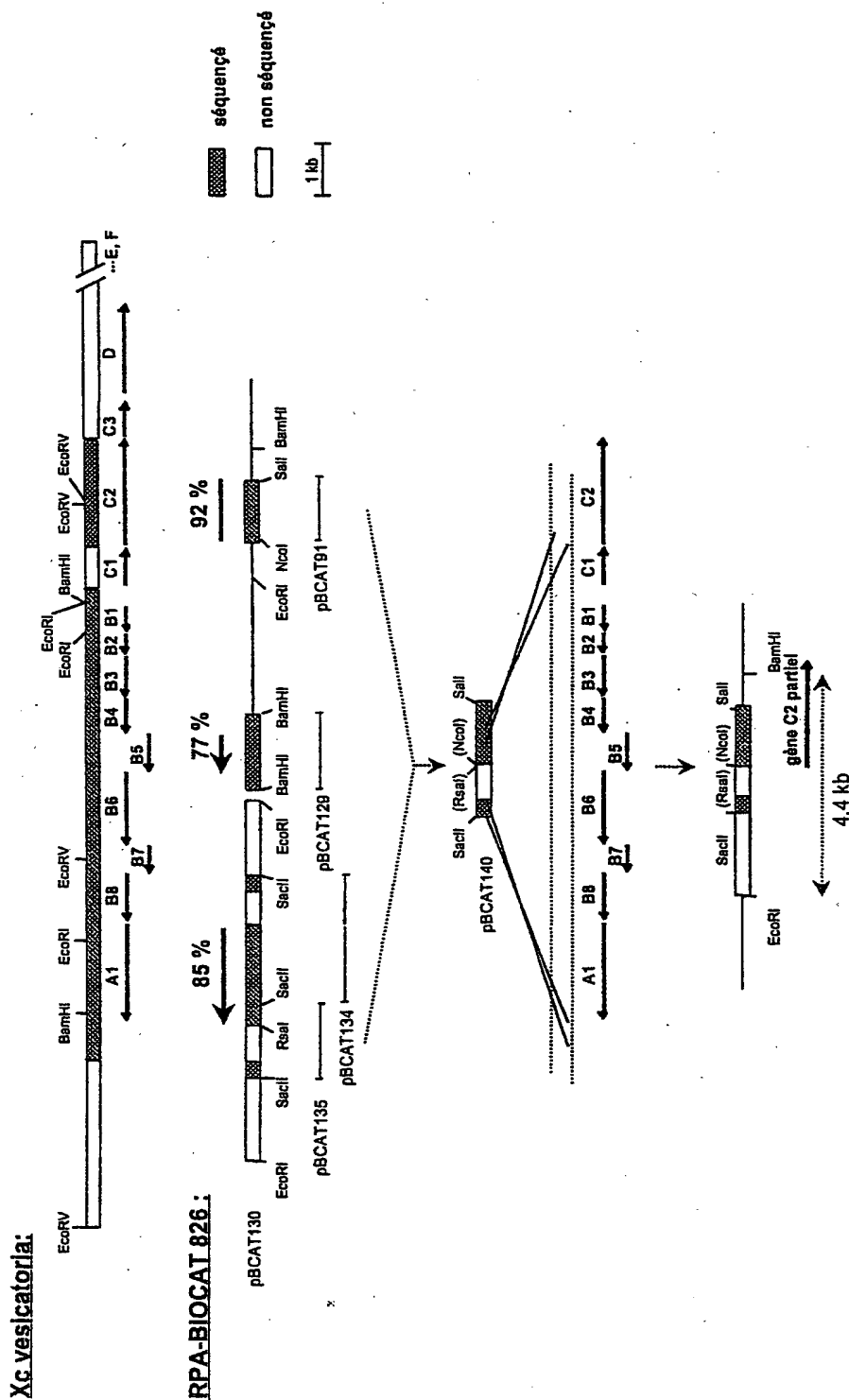
recombinaison homologue avec un plasmide comprenant une délétion de tout ou partie des gènes *hrp* ou *hrc*.

5 16. Procédé de préparation d'exopolysaccharide bactérien, notamment de gomme xanthane, caractérisé en ce que l'on cultive une souche bactérienne, le cas échéant, du genre *Xanthomonas*, de préférence l'espèce *Xanthomonas campestris* selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans des conditions permettant la production d'exopolysaccharide dans le milieu de fermentation.

10 17. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID n° 3.

15 18. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID n° 6.

19. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID n°7.



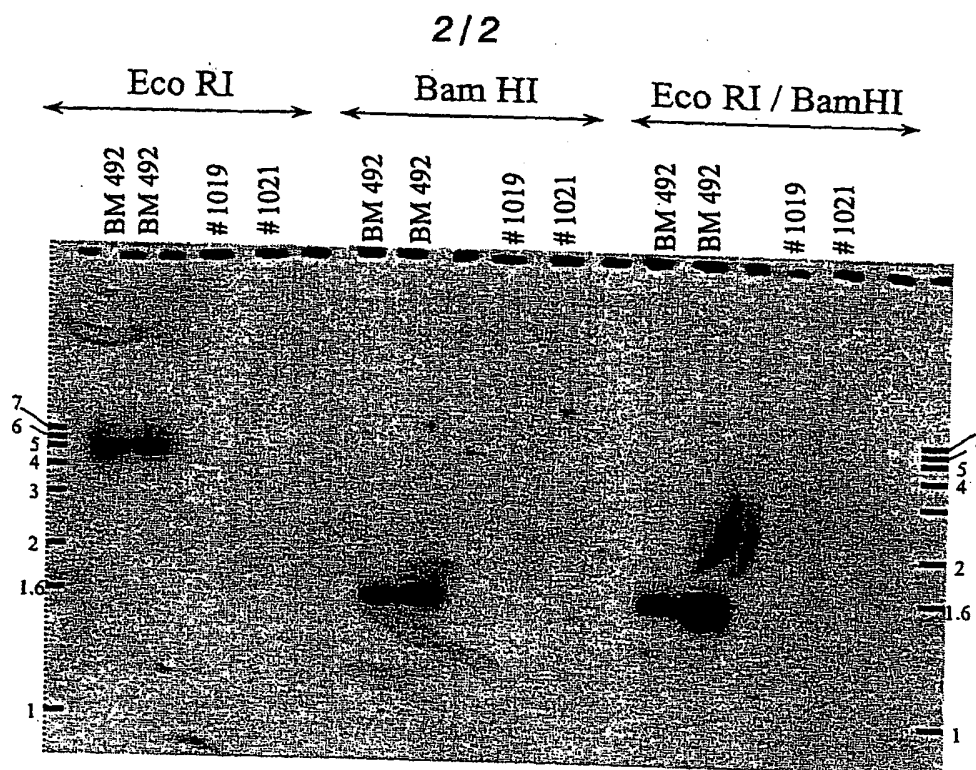


FIG.2

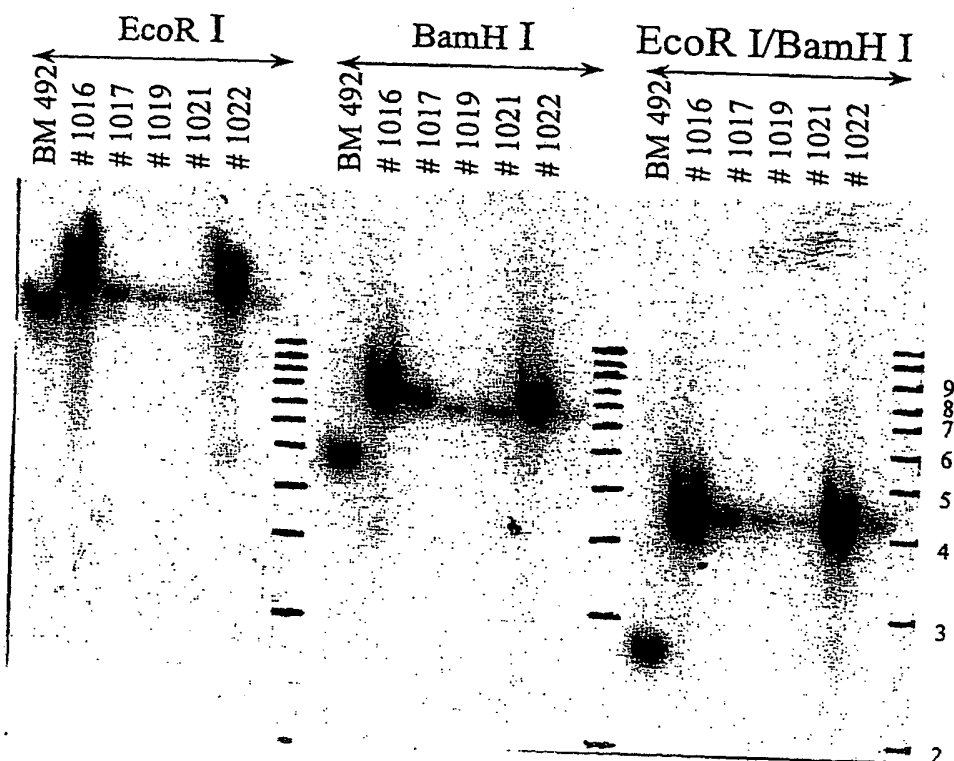


FIG.3

LISTE DE SEQUENCES

<110> RHODIA CHIMIE

<120> Nouvelles souches bactériennes, notamment de
Xanthomonas, en particulier Xanthomonas campestris

<130> BFF 99/0315

<140> FR 9907963

<141> 1999-06-22

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 1

aaattcgatca agggatgatgc

20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 2

gttcacatcg gtcgacaagc

20

<210> 3

<211> 1189

<212> ADN

<213> Xanthomonas campestris

<400> 3

```

aaattcgatca agggatgatgc gatcgccggc ctggatgatca ccatgggtcaa catcttgggc 60
ggcatcgatgg taggcgatgc ctaccacggc atgagcgcg gcgaggccgc caaccgcttt 120
ggcatcctgt cggtaggcga tgcgatggg tcgcagatcg cctcgctgct gatctcggtg 180
ggggccggcg tcatgatcac ccgcgtcgcc aacgagaatg aaaccaagat cagctcgctc 240
gggctcgaca tcggccgcca gtcaccagc aacgcacgtg ccttgatggc agcgagtggtg 300
ctgctggcct gctttgctgt cgtgccggga tttccggcgc tgctgttcct gctgctggca 360
ggggcggtcg gtgcccgggg ctatacgatc tggcgcaagc aacgcgacac cagcgggagc 420
gatcagcccg cactgccatc aaccagccgc aaagggtgcca aaggcgatgc gccgcacatc 480
cgcaagagcg ccccggtatt cgccctcgcc ttgtcgatgc ggctttcgcc gcaactgggt 540
gcacggctcg acccggtgct gctggatcag gcgatcgaaa gcgagcggag gcaattgggtc 600
gagctgctgg gattgccgtt cccggggatc gcgatatggc agagcgaatc cctgcagggc 660
ctgcagtagc aagtgttgat ccacgatgtg ccggaaaccc gcagcgctgt gagcgatacg 720
gcggacatgc agaaagcgct ggcccaacaa gccatcgcac cgttgatgc acgcgcgcac 780

```

```

ctgttcgtcg gcatccagga gacgcagtgg atgctggaac aggtggggcgc ggactatccc 840
gggctgggttg cagaggtcaa caaggccatg ccagcccaac gcatcgccga tgtgttgccg 900
cgactgctgg aagaacgcat cccggtgcgc aacatcaaga gcatcctgga gagcctggtg 960
gtgtgggggac cgaaggaaaa ggatctgctg atgctgaccg agtatgtgcg ctgcgatctc 1020
ggccgctatc ttgcgcacac cgcgaccgca ggcaccggac agctgcctgc ggtgatgctc 1080
gaccacgccg tggaacagtt gatccggcag tcgattcgcg ccacaccggc cggcaatttc 1140
ctggcgctgc caccggagca ggccaatcag cttgtcgacc aggtggaaa 1189

```

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 4

gatccaacag ctggacaacc

20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 5

aacggaatct tcgacaggcc

20

<210> 6

<211> 1818

<212> ADN

<213> Xanthomonas campestris

<400> 6

```

atggcatacg cctgtcctcc agttcaccgc catcgacgcg cgccgttggc cgctgccttg 60
ttgcttggct tgctgccgct gctgccgcgc catgccaacg ccgcgtcggg gccgtggcac 120
tcgcgcagct tcaaatacgt tgccgaccgc aaggatctca aggaggtgct gcgcgacctg 180
tccgccagcc aatccatcac cacctggatt tcaccggagg tgaccggcac gctcagtggc 240
aaattcgaag ccactccgca gaagtttctc gacgatctat cgggcacggt cggttttgtc 300
tggtattacg atggctcggg gctcagaatc tggggcgcgca acgagaccaa gaatgcgacc 360
ttgagtttgg gcgctgcatc gacgagtgcg ctgcgcgatg cgcttgccgc catgcggctg 420
gacgatccgc gctttccggg ccgttatgac gagacagcgc acctggcggg ggtgtcgggc 480
ccgccggggt atgtggatac cgtcgcggcg atcgccaagc aggtcgagca ggtcgcgcgc 540
caacgcgacg ccaccgaagt gcaggtgttt cagctgcatt atgcgcaggc ggccgaccac 600
accaccgcga tcggtgggtca agacatccag gtgccgggca tggccagcct gttgcgcaac 660
atatacggcg tcgctggcgc gccactgcg gcgctgcccg ggccaggcgc gaatttcggg 720
cgtgtgcaac cgatcggcgg tggtcgtcc aataccttcg gcaacagcgg tcagcgccag 780
agtggcggea gcggcattct cggtttgctt gcgtcgtggg tcggcgctgg gtgcgcgtcc 840
gagcgggtgc cggtcagtcc gccgttgccg ggcagtggca atagcgccaa tgcgcgggcc 900
agcgtgtggc cggagatgag ccaggccaga cgcgatgcgc cgctggcggg ggacgcgggc 960
agcggcggtg agctggcatc cgacgcgcgc gtgatcgaag ccgaccgcgc caccaacggc 1020
attctcattc gcgaccgccc cgagcggatg gccgcctatg gcacgttgat ccagcagctc 1080
gacaaccgtc ccaagctgct gcagatcgat gccaccatca tcgagatccg cgacggcgcc 1140
ctgcaggatc tcggcggtga ctggcggttc cacagccggc gtgtggatgt gcagaccggc 1200

```

```

gacggggcgtg gtggccagct tggctacgat ggcagcttga gcggtgcagc agccgccgggt 1260
gcagccgcgc cgttggggcgg gacgttgacc gctgtcctgg gcgatgcagg gcgttacctg 1320
atgacgcgcg tctcgggcgt cgagcagacc aacaaggcca agatcgtctc cccccgcag 1380
gtggcgacgc tggacaacgt ggaagcgggt atggaccaca agcaacaggc attcgtgcgt 1440
gtcagcgggt atgcatccgc cgacctctac aacctgtccg cgggtgtatc gctacgcgt 1500
ttgccaagtg tgggtgccggg gtcgccaaat ggtcagatgc gcctggatgt gcgtatcgaa 1560
gacgggcagt tgggcgcaa taccgtcgat ggcattcccg tcatcacctc cagcgagatc 1620
accacgcagg ccttcgtcaa cgagggccag agcctgctga tcgccgggta tgcttccgac 1680
accgatcaga cagatctgaa caacgtcccc gggctgtcca ggattccatt ggtcggcaac 1740
ctgttcaagc atcgccagca gagcgggtcg cggttgcagc ggttgttcct gctgaccccg 1800
catatcgtct cgccctga 1818

```

<210> 7

<211> 702

<212> ADN

<213> *Xanthomonas campestris*

<400> 7

```

atgcgtcttt ggctgaggtc cacaccggaa gcggtcggcc ttgactgcga ggtcatccca 60
cgcgaggcat tggcctgtgt gctggaactg gacgcagcgg gtgcacagggt gcacgcgcgt 120
tgcgcgagg cgctggcgga cgcccagacg cgtgcgcagg cgctgctcga cgctgccccaa 180
cggcaggccg aggccatcct tcaggatgcc cacgacaggg ccgagcgagc tgcacgcctg 240
ggctatgccg ccgggctgog ccgtcagctc gacgcgtgga acgagcgcg cgtycggcgt 300
gccttcgcgg ccagggacgc cgcacggcgc gccgcgagc gcctggccga gatcgtcgcg 360
cacgcctgcg agcaggttct gcacgggcac gatcctgcgg cgctgtacgc gcgcgccgca 420
caggcgctgg acggcgccct ggacgaggcg aacgccctgc aggtgagcgt gcatcccgat 480
gcgctggacg atgcacggcg cgccttcgat gcggccgcag cggccggcg atggagcatg 540
ccggtggaac tgtcggtgta tacgactctg gccttgggtg cctgcgtgtg cgaatgggat 600
accggcgtgt tcgagaccga tctgcgtgat cagctgcgca gtctccggcg cgtcattcgc 660
cgcgtgttgg ccacgccgca ggcggtgccg gatgcttgct ga 702

```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/00/01725

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/31 C12P19/06 C07K14/21 C12N1/21 //(C12N1/21,
C12R1:64)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBL, STRAND, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAMOUN S ET AL: "A PLANT-INDUCIBLE GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS ENCODES AN EXOCELLULAR COMPONENT REQUIRED FOR GROWTH IN THE HOST AND HYPERSENSITIVITY ON NONHOSTS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY 1990, vol. 172, no. 9, 1990, pages 5165-5172, XP000906789 ISSN: 0021-9193	1-8, 15
Y	abstract --- -/--	9-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 2000

Date of mailing of the international search report

23/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: 1st Application No

PCT/ 0/01725

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ARLAT M ET AL: "XANTHOMONAS-CAMPESTRIS CONTAINS A CLUSTER OF HRP GENES RELATED TO THE LARGER HRP CLUSTER OF PSEUDOMONAS-SOLANACEARUM" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1991, vol. 4, no. 6, 1991, pages 593-601, XP000908703 ISSN: 0894-0282 cited in the application abstract page 598, right-hand column, paragraph 5 page 599, right-hand column, last paragraph</p> <p>-----</p> <p>OSBOURN A E ET AL: "IDENTIFICATION AND DNA SEQUENCE OF A PATHOGENICITY GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1990, vol. 3, no. 5, 1990, pages 280-285, XP000901966 ISSN: 0894-0282 cited in the application abstract</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	<p>1-8,15</p> <p>1,2,4-6</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/01725

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FENSELAU S ET AL: "Determinants of pathogenicity in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatori</i> related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals."</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS., vol. 5, no. 5, October 1992 (1992-10), pages 390-396, XP000908705</p> <p>APS PRESS, ST. PAUL, MN, US</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cited in the application</p>	17-19
Y	<p>the whole document</p> <p>-& DATABASE EMBL 'Online!</p> <p>AC M99176, 10 September 1993 (1993-09-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris HrpC2 gene, complete cds"</p> <p>XP002137003</p> <p>87.2% identity (1188 base pairs) with SEQ ID NO 3</p> <p>-& DATABASE EMBL 'Online!</p> <p>AC U33548, 10 November 1995 (1995-11-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris hrpB pathogenicity locus proteins HrpB1, HrpB2, HrpB3, HrpB4, HrpB5, HrpB6, HrpB7, HrpB8, HrpA1, and ORF62 genes, complete cds."</p> <p>XP002137004</p> <p>78.8% identity (1043 base pairs) with SEQ ID NO 6</p> <p>80.2% identity (702 base pairs) with SEQ ID NO 7</p>	9-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No

PCT 00/01725

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/31 C12P19/06 C07K14/21 C12N1/21 //(C12N1/21,
C12R1:64)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12P C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EMBL, STRAND, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KAMOUN S ET AL: "A PLANT-INDUCIBLE GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS ENCODES AN EXOCELLULAR COMPONENT REQUIRED FOR GROWTH IN THE HOST AND HYPERSENSITIVITY ON NONHOSTS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY 1990, vol. 172, no. 9, 1990, pages 5165-5172, XP000906789 ISSN: 0021-9193	1-8, 15
Y	abrégé --- -/--	9-12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ARLAT M ET AL: "XANTHOMONAS-CAMPESTRIS CONTAINS A CLUSTER OF HRP GENES RELATED TO THE LARGER HRP CLUSTER OF PSEUDOMONAS-SOLANACEARUM"</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1991, vol. 4, no. 6, 1991, pages 593-601, XP000908703</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande abrégé</p> <p>page 598, colonne de droite, alinéa 5</p> <p>page 599, colonne de droite, dernier alinéa</p>	1-8, 15
X	<p>OSBOURN A E ET AL: "IDENTIFICATION AND DNA SEQUENCE OF A PATHOGENICITY GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS"</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1990, vol. 3, no. 5, 1990, pages 280-285, XP000901966</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande abrégé</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1, 2, 4-6

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>FENSELAU S ET AL: "Determinants of pathogenicity in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatori</i> related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals."</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS., vol. 5, no. 5, octobre 1992 (1992-10), pages 390-396, XP000908705</p> <p>APS PRESS, ST. PAUL, MN, US</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande</p>	17-19
Y	<p>le document en entier</p> <p>-& DATABASE EMBL 'en ligne!</p> <p>AC M99176, 10 septembre 1993 (1993-09-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris HrpC2 gene, complete cds"</p> <p>XP002137003</p> <p>* 87.2% d'identité (1188 paires de bases) avec SEQ ID NO 3 *</p> <p>-& DATABASE EMBL 'en ligne!</p> <p>AC U33548, 10 novembre 1995 (1995-11-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris hrpB pathogenicity locus proteins HrpB1, HrpB2, HrpB3, HrpB4, HrpB5, HrpB6, HrpB7, HrpB8, HrpA1, and ORF62 genes, complete cds."</p> <p>XP002137004</p> <p>* 78.8% d'identité (1043 paires de bases) avec SEQ ID NO 6 *</p> <p>* 80.2% d'identité (702 paires de bases) avec SEQ ID NO 7 *</p> <p>-----</p>	9-12